

University of Groningen

## Metaalcomplexen van enige geneesmiddelen; een methode ter bepaling van samenstelling en stabiliteit van metaalcomplexen

Doornbos, Durk Antonius

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1965

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Doornbos, D. A. (1965). *Metaalcomplexen van enige geneesmiddelen; een methode ter bepaling van samenstelling en stabiliteit van metaalcomplexen*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## 10. SAMENVATTING

Dit proefschrift is gewijd aan de ontwikkeling van een nauwkeurige potentiometrische methode ter bepaling van stabiliteitsconstanten van protoncomplexen en metaalcomplexen van enige fysiologisch voorkomende metalen met organische liganden en de toepassing van deze methode op enkele geneesmiddelen: D-penicillamine, N-acetyl-D-penicillamine en de biguaniden metformine, buformine, moroxydine, chlorguanide en chlorproguanil.

De reden hiertoe is de volgende:

Van een aantal in het levend organisme voorkomende metalen is bekend, dat hun fysiologische functie samenhangt met complexvorming van deze metalen met in de cel voorkomende liganden, bijv. enzymen. Bovendien is bekend, dat een groot aantal geneesmiddelen in staat is tot complexvorming met metalen. Het is verleidelijk, en in de literatuur ziet men er meerdere voorbeelden van, hypothesen op te stellen over een mogelijk verband tussen complexvorming en geneesmiddelwerking. Voor het opstellen en de toetsing van dergelijke hypothesen zijn kwantitatieve gegevens betreffende de stabiliteit - in het bijzonder de conditionele stabiliteit - van de metaalcomplexen van geneesmiddelen, respectievelijk natuurlijk voorkomende liganden, onmisbaar. Voor de geneesmiddelen ontbreken deze gegevens in de meeste gevallen. Voor zover zij wel bekend zijn, zijn zij dikwijls niet voldoende nauwkeurig bepaald of zijn de omstandigheden waaronder de proeven zijn uitgevoerd niet beschreven.

In hoofdstuk 2 zijn algemene aspecten van de complexvorming besproken. Nadat was nagegaan welke geneesmiddelen voor complexvorming in aanmerking komen, werd de keuze der geneesmiddelen die in onderzoek zijn genomen voor dit proefschrift beperkt tot de bovengenoemde.

In hoofdstuk 3 zijn de begrippen „microconstante” en „conditionele stabiliteitsconstante” ingevoerd.

In de hoofdstukken 4 en 5 volgt de ontwikkeling van de potentiometrische methode. De pH-bepaling, waarbij het elektroden-

systeem wordt geijkt op buffers, kan geen absolute nauwkeurigheid geven die beter is dan 0.01 pH. Met de in dit proefschrift beschreven methode kan onder gedefinieerde proefomstandigheden een nauwkeurigheid van 0.002 pH worden bereikt. Het gekozen elektroden-systeem bestond uit glaselektrode, zilverelektrode en zoutbrug met natriumperchloraat van de gewenste sterkte. De ionensterkte werd tijdens de proeven (titraties) constant gehouden, evenals de temperatuur. De opstelling van het elektrodensysteem is afgebeeld in fig. 7.1. en fig. 7.2..

Met behulp van de waterstofelektrode werden de elektromotorische efficiëntie  $\beta_e$  en de natriumfout  $\Delta$  mV van de glaselektrode bepaald. De ijking van het elektrodensysteem werd uitgevoerd door een titratie van perchloorzuur met natriumhydroxide. In een aantal punten werd de potentiaal  $E$  gemeten. In het gekozen concentratiegebied kon met vergelijking V.4.10. uit een (lineaire) grafiek  $E_o'$  worden afgelezen. De diffusiepotentiaal  $E_j'$  bleek recht evenredig te zijn met  $[H]$ ; de evenredigheidsfactor  $\omega_H$  werd uit de grafiek afgelezen (4.4.2.). Wordt de ijkoplossing vervangen door een oplossing met onbekende pH ( $< 7$ ) dan kon een voorlopige waarde van  $[H]$  worden berekend met de in 4.4.3. gegeven vergelijking. Door successieve approximatie van  $E_j'$  werd daarna  $-\log [H]$  berekend, totdat twee opeenvolgende berekeningen geen verschil gaven  $> 0.002$  pH.

Door een titratie van natriumperchloraat met natriumhydroxide werd het verband tussen  $E$  en  $[OH]$  vastgesteld. In het gekozen concentratiegebied bleek  $E_j'$  recht evenredig te zijn met  $[OH]$ ; de evenredigheidsfactor  $\omega_{OH}$  werd uit de grafiek afgelezen (4.4.4.). Uit de in 4.4.2. en 4.4.4. beschreven titraties werd  $K_w$  berekend, het ionenproduct van water onder de proefomstandigheden. In 4.4.5. is beschreven hoe met vergelijking V.4.13. door successieve approximatie van  $E_j'$  en  $\Delta$  mV van een oplossing met onbekende pH ( $> 7$ ) de waarde  $-\log [H]$  kan worden vastgesteld.

Voor de bepaling van de zuur-stabiliteitsconstanten werden titraties uitgevoerd van het ligand met natriumhydroxide waarbij in een groot aantal punten  $-\log [H]$  op de beschreven wijze werd berekend. Daaruit werd de protoneringsgraad  $\bar{p}$  berekend (V.5.6.). De aldus gevonden vormingscurven werden getekend en daarna werden volgens de methode der kleinste kwadraten de zuur-stabiliteitsconstanten

berekend uit V.5.3.. Voor de berekeningen werd gebruik gemaakt van een digitale elektronische rekenmachine (Telefunken TR4, programma's in Algol).

Voor de bepaling van de stabiliteitsconstanten van metaalcomplexen werden titraties uitgevoerd van het ligand met natriumhydroxide in aanwezigheid van metaalionen, waarbij in een groot aantal punten  $-\log [H]$  werd berekend. Daaruit werden de vrije ligandconcentratie (V.5.11.) en de complexeringsgraad  $\bar{n}$  (V.5.15.) berekend. De aldus gevonden vormingscurven werden getekend en daarna werden volgens de methode der kleinste kwadraten de complex-stabiliteitsconstanten berekend met V.5.13.. Ook voor deze berekeningen werd gebruik gemaakt van de Telefunken TR4; voor de berekening van de zuur-stabiliteitsconstanten en de complex-stabiliteitsconstanten werd hetzelfde programma gebruikt.

Bij L-cysteïne en D-penicillamine spelen behalve de reeds genoemde zuur-stabiliteitsconstanten ook de zogenaamde microconstanten - de individuele zuur-stabiliteitsconstanten van de SH- en de  $NH_3^+$ -groep - een rol. Door variatie van  $-\log [H]$  en meting van de bijbehorende U.V.-absorptie werd het verband tussen deze twee grootheden bepaald. Volgens de methode der kleinste kwadraten werden m.b.v. de Telefunken TR4 de microconstanten berekend.

De berekende zuur-stabiliteitsconstanten van L-cysteïne, D-penicillamine en N-acetyl-D-penicillamine zijn vermeld in de tabellen 9.6., 9.7. en 9.8., de complex-stabiliteitsconstanten in de tabellen 9.12., 9.13. en 9.14.. De micro-zuur-stabiliteitsconstanten van L-cysteïne en D-penicillamine zijn opgenomen in tabel 9.9.. Een samenvatting van de resultaten voor de genoemde drie stoffen is vermeld in 9.2.3.3..

Voor een vergelijking van de mate van complexvorming van verschillende liganden bij een bepaalde pH zijn de complex-stabiliteitsconstanten niet zonder meer bruikbaar, daar het aanbod van vrij ligand mede wordt bepaald door de zuur-stabiliteitsconstanten. Daarom werden de begrippen „conditionele stabiliteitsconstante” en „nevenreactie-coëfficiënt” besproken (3.1.6., 5.1.4.). De nebenreactie-coëfficiënten voor de reacties van L-cysteïne, D-penicillamine en N-acetyl-D-penicillamine met protonen werden berekend (9.4., tabel 9.20., fig. 9.24). Uit de voor deze drie liganden gevonden complex-

stabiliteitsconstanten en nevenreactie-coëfficiënten kunnen bij alle gewenste pH's de conditionele stabiliteitsconstanten worden berekend; een voorbeeld van een dergelijke berekening is in 9.4. gegeven.

Bij de titraties van de biguanide-hydrochloriden werd geconstateerd dat in zuur milieu nog een proton kon worden gebonden. Bij metformine-HCl en buformine-HCl kon uit de vormingscurven worden afgeleid, dat bij hoge pH twee protonen ongeveer gelijktijdig werden afgesplitst. Bij moroxydine-HCl kon wat dit betreft geen conclusie worden getrokken, terwijl bij chlorguanide-HCl en chlorproguanil-HCl in het onderzochte pH-gebied slechts één proton werd afgesplitst. De berekende zuur-stabiliteitsconstanten zijn vermeld in de tabellen 9.15. t/m 9.19.. De biguanide-hydrochloriden bleken zeer zwak zure eigenschappen te hebben.

Slechts bij enkele metalen kon complexvorming worden geconstateerd; bij de meeste metalen trad hydrolyse van het metaalion op. Waar metaalcomplexen werden gevormd, waren deze slecht oplosbaar. De stabiliteitsconstanten van de metaal-complexen konden niet door potentiometrische titratie worden bepaald. Door bereiding en isolering van de metaalcomplexen en daaropvolgende elementanalyse kon echter worden aangetoond, dat bij alle onderzochte biguanide-hydrochloriden twee protonen konden worden afgesplitst, waarvan één direct bij de vorming van het complex. In het algemeen zullen dus geprotoneerde biguanide-complexen kunnen bestaan.

Gezien het zeer zwak zure karakter van de biguanide-hydrochloriden zal bij fysiologische pH's slechts een zeer kleine fractie in de vorm van het vrij ligand voorkomen. Het is daarom twijfelachtig of van deze stoffen de werking verband zou kunnen houden met complexvorming; voortgezet onderzoek op dit terrein is wenselijk.

## SUMMARY

In this thesis an accurate potentiometric method is developed for the determination of stability constants of acids (proton complexes) and metal complexes of biochemically important metals with organic ligands. The method has been applied to complexes of the following drugs: D-penicillamine, N-acetyl-D-penicillamine and the biguanides metformine, buformine, moroxydine, chlorguanide and chlorproguanil (see p. 78).

The physiological function of a number of metals is known to be related to complex formation by biologically occurring ligands, e.g. enzymes. It is also well-known that many drugs have complexing ability. Thus, it is tempting to set up a theory or hypothesis about the possibility of drug-action by formation of metal complexes. To test such a hypothesis an exact knowledge of the stability (particularly the "conditional stability") of metal complexes of drugs and naturally occurring ligands is indispensable. For most metal complexes of drugs, however, the stability is not known or has been determined with insufficient accuracy.

In chapter 2 of this thesis general aspects of complex formation are discussed. Drugs having complexing ability are listed; in this thesis the investigations are limited to the above mentioned substances.

In chapter 3 the concepts "microconstant" and "conditional constant" have been introduced and discussed.

Chapters 4 and 5 give the description of the potentiometric method. Calibration of pH-electrode systems by buffer solutions cannot give an accuracy better than 0.01 pH units. An accuracy of 0.002 in  $-\log [H]$  can be obtained under well-defined experimental conditions, as described in this thesis. In this method one employs an electrode system consisting of a glass electrode, a silver electrode and a salt bridge with sodium perchlorate (0.1 M resp. 0.5 M). Ionic strength and temperature were kept constant during the titrations. Photographs of the assembly are shown in figs. 7.1. and 7.2.

By comparing the response of the glass electrode with that of a hydrogen electrode the electromotive efficiency  $\beta_e$  and the sodium error  $\Delta$  mV of the former have been determined.

The electrode system is calibrated by a titration of perchloric acid with sodium hydroxide. The potential  $E$  is recorded during the titration. From a graphic representation of the left hand side of expression V.4.10. the constants  $\omega_H$  and  $E_o'$  can be determined as a function of  $[H]$ , (fig. 4.1.).

A preliminary value of an unknown pH ( $< 7$ ) could be calculated from the equation given in 4.4.3., when the values of  $E$ ,  $E_o'$  and  $\omega_H$  are known. The exact value of  $-\log [H]$  was calculated by successive approximation of the liquid junction potential  $E_j'$ .

By means of a titration of sodium perchlorate solution with sodium hydroxide the relation between  $E$  and  $[OH]$  has been determined. The liquid junction potential  $E_j'$  was found to be directly proportional to  $[OH]$ ; the proportionality factor  $\omega_{OH}$  was read from a graph (fig. 4.2., 4.4.4.). The value of the ionic product constant of water  $K_w$  can then be calculated under the prevailing experimental conditions. (4.4.4.). The determination of an unknown pH ( $> 7$ ) by successive approximation of  $E_j'$  and  $\Delta$  mV (V.4.13.) has been described in 4.4.5.

For the determination of stability constants of acids, titrations of the ligands were performed by step-wise addition of sodium hydroxide in a medium of constant ionic strength. After each step,  $-\log[H]$  was calculated as described above. From each value of  $-\log[H]$  and the known stoichiometric concentrations the degree of protonation  $\bar{p}$  was calculated (V.5.6.). The graphs of the formation functions (V.5.3.) were drawn and the stability constants were calculated by a computer. (Telefunken TR4) with a least-squares method, programmed in Algol.

For the determination of stability constants of metal complexes titrations were performed of solutions containing ligand and metal (in varying concentrations) by step-wise addition of sodium hydroxide in a medium of constant ionic strength. After each step,  $-\log [H]$  was calculated. From each value of  $-\log [H]$  and the known stoichiometric concentrations, the concentration of "free ligand" (V.5.11.) and the degree of complexation  $\bar{n}$  (V.5.15) were calculated. The graphs of the formation functions were drawn and the stability constants of the metal complexes were calculated in exactly the same way as those of the acids.

In the cases of L-cysteine and D-penicillamine not only the acid

stability constants must be known, but also the microconstants, the individual stability constants of  $-\text{SH}$  and  $-\text{NH}_3^+$ . These constants were determined by U.V. absorptiometry on the thiolgroup and calculated with a least-squares procedure by the TR4.

## Results

### *L-Cysteine, D-penicillamine and N-acetyl-D-penicillamine*

The acid stability constants of L-cysteine, D-penicillamine and N-acetyl-D-penicillamine are given in tables 9.6., 9.7. and 9.8.; the stability constants of the metal complexes are tabulated in tables 9.12., 9.13. and 9.14. The micro acid stability constants of L-cysteine and D-penicillamine are shown in table 9.9. The first proton is more firmly bound by D-penicillamine than by L-cysteine, whereas the reverse is true for the second proton. The overall-basicity of fully deprotonated penicillamine is greater than that of cysteine.

From the microconstants it can be concluded that the basicity of  $-\text{NH}_2$  is greater than that of  $-\text{S}^-$  for both cysteine and penicillamine. From tables 9.8. and 9.9. it follows that acetylation of  $-\text{NH}_2$  does not alter the basicity of  $-\text{S}^-$  in N-acetyl-D-penicillamine.

L-Cysteine and D-penicillamine form stable 1 : 1- and 2 : 1-complexes with Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Hg and Pb. For these metals  $K_1 > K_2$ , except for Ni ( $K_1 < K_2$ ). In general the difference between  $K_1$  and  $K_2$  is small; for Pb however  $K_1 \gg K_2$  and moreover this metal forms 3 : 1-complexes. With Hg a very stable 2 : 1-complex is formed; the stability constant could not be calculated.

N-Acetyl-D-penicillamine forms complexes with Mg, Co, Ni, Zn, Cd, Hg and Pb. For Mn, Cd and Pb  $K_1 > K_2$  whereas for Co, Ni and Zn  $K_1 < K_2$ .

The order of the stability constants  $K_1$  of the complexes formed with the divalent metal ions is

L-cysteine:



D-penicillamine:



N-acetyl-D-penicillamine:





For each of the metals studied the stability constant of the complex with D-penicillamine is larger than that with L-cysteine. The stability constants of the complexes with N-acetyl-D-penicillamine are much smaller.

Stability constants cannot be used to compare the complexing ability of different ligands at the same pH, because the quantity of the complexing species, the free ligand, depends both on the stability constants of proton- and metalcomplex. Therefore, the conditional constants and the side reaction coefficients are discussed. The side reaction coefficients  $\alpha_L$  for the reactions of L-cysteine, D-penicillamine and N-acetyl-D-penicillamine with protons were calculated (9.4., table 9.20., fig. 9.24.). From the stability constants given in tables 9.12., 9.13. and 9.14. and the side reaction coefficients it is possible to calculate the conditional constants at any pH; an example of such a calculation has been given (9.4.).

### *The biguanides*

From the titrations of the biguanide hydrochlorides it was found that in an acid medium a second proton is accepted by the ligands. From the formation curves of metformine-HCl and buformine-HCl it was deduced that in alkaline medium two protons were dissociated almost simultaneously. For moroxydine-HCl this could not be confirmed, whereas for chlorguanide-HCl and chlorproguanil-HCl not more than one proton was dissociated in the pH-range studied. The calculated acid stability constants are given in tables 9.15. through 9.19. The biguanide hydrochlorides appeared to have very weak acidic properties.

The order of basicity of the biguanide hydrochlorides is: buformine > metformine > moroxydine > chlorguanide > chlorproguanil for  $\mu = 0.1$  and  $\mu = 0.5$ . The basicity is greater for  $\mu = 0.5$  than for  $\mu = 0.1$  (tables 9.15.—9.19.).

Complex formation could be found with a few metals only (Cu, Ni, Co); most metals were hydrolysed during the titration. The complexes, if formed, were nearly insoluble. Stability constants of the metal complexes could not be determined potentiometrically.

The complexes were isolated and analysed for C, H, N, Cl and the metal. For the biguanide hydrochlorides investigated it could

be established that on complex formation one or two protons dissociated, depending on the pH of the solution. Thus, protonated metal complexes can exist.

In view of the very weak acidic properties of the biguanide hydrochlorides only a very small fraction of the ligand will be in the free ligand form at physiological pH. In this group, therefore, it is questionable that drug-action is related to complex formation. Further research in this field will be necessary.